

Aliphatische Di- und Polyamine im Säuglingsstuhl

Analytische Methoden

Peter Waizenegger

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Universitäts-Kinderklinik München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

Aliphatische Di- und Polyamine im Säuglingsstuhl
Analytische Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Peter Waizenegger
aus
München

1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bremer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Betke

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1974



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
A. Cadaverin und Putrescin	1
1. Vorkommen	1
2. Synthese und Abbau von aliphatischen Aminen	1
a. Im tierischen Organismus	1
b. In Mikroorganismen	2
3. Bedeutung der Diamine	3
B. Spermin und Spermidin	4
1. Vorkommen	4
2. Synthese und Abbau der Polyamine	
Spermin, Spermidin	6
a. Im tierischen Organismus	6
b. In Mikroorganismen	6
3. Physiologische und pharmakologische Wirkung	8
Untersuchungen über die Ausscheidung von Di- und Polyaminen im Urin des Menschen.	9
Untersuchungen über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im Stuhl von Mensch und Tier.	10
Fragestellung	11
Material und Methoden	12
A. Materialien	12
B. Probanden	12
C. Aufarbeitung des Stuhls	12
D. Die quantitative Bestimmung der Di- und Polyamine mit Hilfe der Säulenchromatographie	13
Ergebnisse	13
A. Säulenchromatographischer Nachweis der aliphatischen Di- und Polyamine im Stuhl	13

B. Berechnung der Di- und Polyamine nach säulenchromatographischer Trennung	14
C. Verluste bei der Aufbereitung des Stuhls	15
Diskussion	15
Zusammenfassung	16
Tabellen	18
Literaturverzeichnis	22
Abbildungen	28

Einleitung

A. Cadaverin und Putrescin

1. Vorkommen

Im Jahre 1885 isolierte Brieger zwei Basen aus faulenden tierischen Organen, die er Cadaverin und Putrescin nannte (1). Chemisch erwiesen sie sich als 1, 5-Diaminopentan (Cadaverin) und 1, 4-Diaminobutan (Putrescin). Die Entstehung von Cadaverin und Putrescin wurde seitdem bei der bakteriellen Zersetzung verschiedener eiweißhaltiger Naturprodukte beobachtet, z.B. bei der Fäulnis von Pferdefleisch, Eiereiweiß und Pankreas. Ferner ließen sich beide Substanzen in Käse, in Sojabohnen und im Sauerkraut nachweisen (2).

Untersuchungen mit Fäulnisbakterien zeigten, daß Cadaverin und Putrescin aus Lysin und Ornithin entstehen. Spezifische bakterielle Dekarboxylasen bewirkten die Diaminbildung (3).

Auch in Pflanzen ließen sich aliphatische Diamine nachweisen: Im Mutterkorn, in Hefen, in Pilzen sowie unter den Nebenalkaloiden von *Datura stramonium* und *Atropa belladonna* (2). Herbst und Mitarbeiter (4) wiesen Putrescin in Citrusfrüchten nach, ein Befund, der später bestätigt werden konnte (5). In Citrusfrüchten fand sich außerdem Feruloylputrescin (6).

Im Jahre 1889 wurde erstmals über die Ausscheidung von Cadaverin und Putrescin im menschlichen Urin berichtet. Von Udránszky und Baumann (7) isolierten aus dem Urin eines Patienten mit Cystinurie große Mengen Cadaverin und etwas kleinere Mengen Putrescin. Im Stuhl dieses Patienten lagen die beiden Diamin in umgekehrtem Verhältnis vor.

2. Synthese und Abbau von aliphatischen Diaminen:

a) im tierischen Organismus:

Dekarboxylasen verschiedener Darmbakterien dekarboxylieren Lysin zu Cadaverin. Das direkte Dekarboxylierungsprodukt von Arginin ist Agmatin. Arginin wird jedoch durch die Darmbakterien vorwiegend über Ornithin in Putrescin umgewandelt, da das pH im Darmtrakt diesen Abbauweg begün-

stigt (8).

Nach der Resorption im Colon - aber wahrscheinlich auch im Darm selbst - werden die Diamine mit Hilfe von Diamino-Oxydasen zu den entsprechenden Aldehyden abgebaut: Aus dem Cadaverin entsteht dabei ϵ -Aminovaleraldehyd und aus dem Putrescin γ -Aminobutyraldehyd (9). Die genannten Aldehyde können sich daneben aber auch spontan in die heterozyklischen sekundären Amine Piperidin und Pyrrolidin umwandeln. Beide werden ständig im Urin gesunder Menschen ausgeschieden (11). Im Urin von Patienten mit Cystinurie wurden sie vermehrt gefunden (10). Nach oraler Verabfolgung von Cadaverin oder Lysin an Kaninchen beobachtete Nordenström einen erheblichen Anstieg der Piperidinausscheidung; dieser Anstieg fehlte nach parenteraler Zufuhr dieser Substanzen (12).

Ein Enzym mit Diamino-Oxydase-Aktivität kommt in verschiedenen Organen und im Plasma vor. Hochgereinigt wurde eine Diamino-Oxydase aus Schweinenieren gewonnen (9). Im menschlichen Plasma beträgt das Verhältnis der Diamino-Oxydase-Aktivität von mütterlichem zu fetalem Plasma 166 : 1 (15). Große Aktivitäten enthält die Darmschleimhaut, wo vermutlich der größte Teil der im Darminhalt gebildeten Diamine abgebaut wird. In der Leber findet außerdem eine Dekarboxylierung von Ornithin zu Putrescin statt. Der überwiegende Teil dieses Putrescins wird offensichtlich zur Synthese von Spermidin und Spermin verwendet. Leber enthält selbst immer Putrescin in relativ geringer Konzentration. Im Urin gesunder Menschen werden alipathische Diamine nicht oder nur in Spuren ausgeschieden (2).

b) in Mikroorganismen:

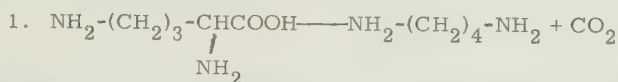
Die Synthese von Putrescin in Mikroorganismen wurde an Kulturen von *E. coli* beobachtet. Sie verläuft über zwei Wege:

Wege:

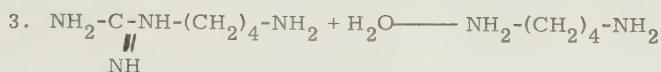
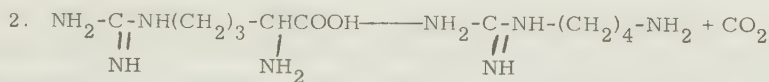
1. Direkt durch Decarboxylierung von Ornithin mit Hilfe der "biosynthetischen Ornithin-Decarboxylase", so bezeichnet von Morris und Pardee (13).

Unterschieden davon wird die abbauende Decarboxylase (3). Die beiden Enzyme unterscheiden sich durch ihr pH-Optimum, die Hitzestabilität und

durch die Bedingung ihrer Entstehung (13).



2. Umwandlung von Arginin zu Putrescin. Arginin wird zu Agmatin decarboxyliert, welches dann hydrolysiert wird. Man unterscheidet auch hierbei die synthetische Decarboxylase von der abbauenden Decarboxylase und zwar durch das unterschiedliche pH-Optimum und den Verbrauch von Mg-Ionen (13).



Man konnte im Experiment den Abbau von Putrescin zu γ -Butyraldehyd an zellfreien Extrakten bei einer Reihe von Mikroorganismen, so z.B. *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium diptheriae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas*-Arten, beobachten. Zwei Enzyme spielen dabei eine Rolle: Eine Diamin- α -Ketoglutarat-Transaminase und eine Diamono-Oxydase (14).

Die Aminosäure-Decarboxylasen sind in zahlreichen Bakterien gefunden worden, so z.B. in *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (3).

3. Bedeutung der Diamine

Über die Bedeutung der Diamine im tierischen und menschlichen Organismus ist bis heute kaum etwas bekannt. Hanke und Koessler (16) glaubten in der bakteriellen Produktion von Aminen in saurem Milieu einen Schutzmechanismus gegen die Anhäufung von H^+ -Ionen zu sehen.

In der älteren Literatur werden die Diamine widersprüchlich einerseits als giftig, andererseits als harmlos beschrieben (7).

Johnston (18) berichtete 1928, daß Cadaverin für Frösche und Kaninchen nicht toxisch war, jedoch eine Muskelrelaxation verursachte und eine besondere Affinität zur Niere besitze.

In toxischen Dosen riefen Cadaverin und Putrescin hauptsächlich Erscheinungen des Zentralnervensystems und zwar Krämpfe, Paresen und Kreislauf-Atemstörungen, hervor (2).

Putrescin schien die Entgiftung des Histamins zu verzögern und im Experiment die Wirkung kleiner intravenös verabreichter Histamingaben zu verstärken bzw. zu verlängern (19).

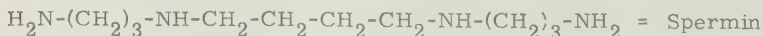
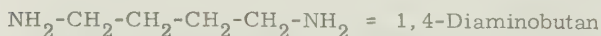
Obwohl Putrescin in kleinen Mengen in tierischen Organen vorkommt, ist es wegen seiner niedrigen Konzentration unwahrscheinlich, daß es analog dem Spermidin und Spermin wesentlich zur Stabilisierung der Mikrosomen beiträgt.

Bereits Brieger (1) vermutete einen Zusammenhang zwischen der toxischen Wirkung einer Cholerainfektion und der vermehrten Cadaverinentstehung im Darm. Veeraraghavan und Mitarbeiter (17) sahen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Darmsymptomatik bei Cholera und der bei beiner von ihnen experimentell erzeugten Cholerainfektion vermehrt anfallenden Menge von Cadaverin. Gesichert ist dieser pathogenetische Mechanismus aber keineswegs.

B. Spermin und Spermidin

1. Vorkommen

Die Polyamine Spermin und Spermidin sind in der Natur weit verbreitet. Sie sind als Derivate des 1,4-Diaminobutans (Putrescin) aufzufassen.



Leeuwenhoek (20) beschrieb bereits 1678 in seiner Arbeit über die Spermatozoen das Vorhandensein von Spermin-Kristallen, ohne sie genauer zu iden-

tifizieren. Mit der Neuentdeckung durch Böttcher wurden sie als Böttchersehe Kristalle bezeichnet (21). Schreiner schließlich konnte das Spermin auch in vielen anderen Geweben nachweisen. Er identifizierte die Kristalle als Phosphat einer organischen Base. Der Name Spermin geht auf ihn zurück (22).

Rosenheim ermöglichte es mit einer Präzipitationsmethode, Spermin aus dem Sperma, aus verschiedenen tierischen Organen und aus der Hefe darzustellen (23). Neben dem Spermin fanden sie regelmäßig auch Spermidin. Die Struktur beider Polyamine wurde von Dudley und Rosenheim (23) geklärt.

In neuerer Zeit wurden durch chromatographische Methoden wesentliche Erkenntnisse über Vorkommen und Funktion der Polyamine gewonnen. Voraussetzung dafür waren Methoden, die zum Nachweis auch kleinerer Mengen geeignet waren (24, 25, 26, 27, 33).

Die höchsten Konzentrationen an Spermin und Spermidin in tierischen Organen wurden in der Prostata, im Pankreas, in der Leber und Milz (24), im Nervengewebe (28, 29), in der Muskulatur (30) und in embryonalen Geweben (31) gefunden.

Rosenthal und Tabor berichten über das Vorkommen von Spermin im Blut von Mäusen, Ratten und des Menschen. Dabei fanden sie die Polyamine in den Blutzellen, nicht jedoch im Plasma (24).

Spermin und Spermidin kommen außerdem in Gift der Vogelspinne (26), in der Seidenraupe (39) und in Getreidekeimlingen vor (40).

Beim Menschen wurden Polyamine im Sperma, im Pankreas, in der Leber und Lunge (33), sowie in Reticulocyten und im Gehirn gefunden (28).

Noch wenig weiß man über ein sogenanntes "Malignolipin", welches aus malignem Tumorgewebe isoliert wurde (34), ein Phospholipid, das als Bestandteil u.a. Spermidin enthält.

Auch in verschiedenen Mikroorganismen wurden hohe Konzentrationen an Spermin und Spermidin (daneben regelmäßig auch Putrescin) nachgewiesen, so z.B. in *E.coli* (35), *Azotobakter vinelandii* (36), und besonders in gram-

negativen Bakterien (37, 43).

Vielleicht von besonderer Bedeutung scheint für Bakteriophagen der hohe Gehalt an Polyaminen zu sein, wie er z.B. in einigen Phagenstämmen von *E.coli* beschrieben wurde (38).

Untersuchungen an Bakterien über die intrazelluläre Verteilung der Polyamine ergaben, daß diese in der Ribosomenfraktion vorzufinden sind (27, 41). In Leberzellen sind die Polyamine ebenfalls in den Ribosomen lokalisiert (41). Raina (42) fand in mikrosomalen Partikeln, gewonnen aus Rattenleber, Polyamine an RNS gebunden. Shimizu und Mitarbeiter (28) berichten über die Lokalisation von Spermin in den Nukleoli von Blutzellen.

2. Synthese und Abbau der Polyamine Spermin und Spermidin

a) im tierischen Organismus

Der Stoffwechsel der Polyamine in den Organen der Säugetiere ist in letzter Zeit ein wenig bekannt geworden.

Raina (42) wies mit den Mitteln der radioaktiven Markierung die Entstehung von Spermidin aus Methionin, Ornithin und Putrescin bei der Ratte nach. Putrescin nahm er als direkte Vorstufe von Spermidin an.

Siimes (73) bewies in seiner Arbeit, ebenfalls mit den Mitteln der radioaktiven Markierung, die Synthese von Spermin aus Spermidin in verschiedenen Organen der Ratte.

Aus dem Plasma von Rindern ist von Tabor und Mitarbeiter (44) eine unspezifische Amino-Oxydase isoliert worden, die neben einer Reihe anderer Amine auch Spermin und Spermidin oxydiert.

Die Oxydation von Spermidin erfolgt am endständigen C-Atom, daraus entstehend ein Di-Aldehyd mit der gleichen Anzahl von C-Atomen wie Spermidin (45).

b) in Mikroorganismen

Tabor und Mitarbeiter (36) untersuchten die Synthese der Polyamine in Mikroorganismen an *E.coli*. Dabei wurde im zellfreien Extrakt gezeigt, wie

Putrescin in Gegenwart von ATP, Mg^{++} und Methionin in Spermin und Spermidin eingebaut wird. Dabei wurde markiertes Putrescin verwendet. S-Adenosylmethionin wird durch Decarboxylierung in S-Adenosyl-(5')-3-methylmercaptopropylamin und (5')-Methyladenosin umgewandelt. Letzteres reagiert mit Putrescin unter Bildung von Spermidin. Spermin wird durch Kopplung von Spermidin mit einem weiteren Molekül S-Adenosyl-(5')-3-mercaptopropylamin gebildet.

1. $ATP + L\text{-Methionin} \xrightarrow{Mg^{++}} S\text{-Adenosylmethionin}$
2. $S\text{-Adenosylmethionin} \longrightarrow S\text{-Adenosyl (5')(-3-methylmercaptopropylamin)}$
3. $S\text{-Adenosyl (5')-3-methylmercaptopropylamin} + \text{Putrescin} \longrightarrow \text{Spermidin} + \text{Thiomethyladenosin}$

Bei den Mikroorganismen wurden zwei Abbauewege beobachtet: Der oxydative Abbau (47) und die Bildung von Derivaten, so z.B. N-Acetylderivate (46). Dubin und Rosenthal (46) beobachteten an *E. coli* die Umwandlung in N-Acetylderivate und isolierten dabei folgende Substanzen:

Monoacetylputrescin, 2 isomere Formen von Monoacetylspermidin, Monoacetylspermin, sowie Diacetylspermin (46).

Der oxydative Abbau wurde von Bachrach auf Grund seiner Beobachtungen bei einem Stamm von *Serratia marcescens* beschrieben (47). Als Endprodukte fand er 1,3-Diaminopropan und γ -Aminobuttersäure, die sich unter Ringschluß in Δ_1 -Pyrrolin verwandelte. Einige Bakterien oxydierten das 1,3-Diaminopropan weiter unter Bildung von β -Alanin, wie es z.B. von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wurde (48). Dagegen wurde bei Versuchen mit *Serratia marcescens* kein weiterer Abbau von 1,3-Diaminopropan bemerkt (47). 1,3-Diaminopropan in Mikroorganismen stammt also vermutlich aus dem Spermidin-Stoffwechsel (51).

3. Physiologische und pharmakologische Wirkung

Obwohl die Polyamine in der Natur weit verbreitet sind, weiß man wenig über ihre spezifischen biologischen Funktionen. Am wenigsten weiß man über ihre Bedeutung in tierischen Geweben. In jüngerer Zeit sind einige Hypothesen aufgestellt worden.

Erkenntnisse über die eventuelle physiologische Bedeutung der Polyamine wurden beim Wachstum von Mikroorganismen gewonnen. Spermin und Spermidin (daneben auch Putrescin und 1,3-Diaminopropan) sollen für eine Anzahl von Bakterien als essentielle Wachstumsfaktoren (49, 50, 51) notwendig sein.

Die Polyamine haben weiterhin eine Beziehung zu Nukleinsäuren. Nach mehreren Untersuchungen haben die Polyamine zu Nukleinsäuren eine starke Affinität und bilden mit ihnen Komplexe (48, 52, 53, 54). Ames u.a. sahen in bestimmten Bakteriophagen einen Polyamin-DNS-Komplex (55), wobei die Polyamine die Neutralisation der sauren Gruppen der DNS übernehmen sollen. Zillig und Mitarbeiter vermuteten, daß die Polyamine für den strukturellen Zusammenhalt der Ribosomen notwendig sind (27). Sie stellten in Ribosomen von *E.coli* und Leberzellen einen Gehalt an Di- und Polyaminen fest, der ausreichte, um ein Drittel der sauren Gruppen der RNS zu neutralisieren.

Caldarera u.a. nahmen einen stimulierenden Einfluß der Polyamine auf die DNS-Synthese an (31). Sie beobachteten, daß Polyamine besonders reichlich in Geweben mit rascher Zellproliferation vorhanden waren. Außerdem stellten sie in Experimenten an Hühnerembryonen fest, daß während der Entwicklung der Embryonen ein Konzentrationsanstieg sowohl der Nukleinsäuren als der Polyamine zu sehen war. Daraus folgerten sie eine wichtige Bedeutung der Polyamine für im Wachstum befindliche Gewebe.

Diese Hypothese konnte auch durch die Arbeit von Brewer (56) gestützt werden, der einen stimulierenden Effekt von Spermin auf die Aktivität der DNS-Polymerase bemerkte. Auch Dykstra sah einen erheblichen Anstieg der Spermidin-Menge in regenerierenden Leberzellen nach teilweiser Hepatektomie (57).

Als pharmakologische Eigenschaft wurde von Spermin eine Nephrotoxizität

hervorgehoben. Allein die einmalige Injektion einer bestimmten Spermin-dosis genügte bei Mäusen, Ratten und Kaninchen, um Nekrosen der proximalen Tubulusepithelien mit konsekutivem akuten Nierenversagen zu erzeugen (58).

Bei Cadaverin, Putrescin und Spermidin wurde diese starke Wirkung nicht gesehen.

De Meis beobachtete, daß Spermin und Spermidin die ATPase-Aktivität an in Glycerin eingebetteten Myofibrillen hemmten (30).

In höheren Konzentrationen soll Spermin auch eine bakterizide Wirkung auf wachsende Kulturen von *E. coli*, vergleichbar der Wirkungsweise von Streptomycin, haben (59).

Untersuchungen über die Ausscheidung von Di- und Polyaminen im Urin des Menschen

Frühere Untersuchungen beschränken sich fast ausschließlich auf Patienten mit Cystinurie. Erstmals im Jahre 1889 wurde in der Arbeit von Udránszky und Baumann (7) davon berichtet. Außerdem arbeitete Stadthagen und Brieger (60), Garcia (61), Ackermann und Kutscher (62) sowie Garrod (63) darüber. In neuerer Zeit befaßten sich vor allem Milne und Mitarbeiter (10) mit solchen Untersuchungen. Nach Fällung der Diamine mit Benzoylchlorid und gravimetrischer Messung bestimmten sie im 24 Std.-Urin der Patienten Tagesmengen von 0,2 - 0,4 Gramm an Benzoyldiaminen.

Diese Ergebnisse jedoch wurden von einer Reihe von Autoren bestritten (63, 64).

Bei normalen Probanden ließen sich nach der übereinstimmenden Aussage aller Autoren keine Diamine im Urin nachweisen (7, 60, 63, 64, 65).

Interessant ist das Zusammentreffen von Diaminurie mit anderen Krankheiten. Hunter beobachtete eine Cadaverin-Ausscheidung bei einem Fall von perniziöser Anämie (63), während Brieger (1) und Roos (63) in einigen Fällen von Dysenterie und Cholera Cadaverin im Urin nachweisen konnten.

In den letzten Jahren wurde neben Cadaverin und Putrescin 2,2'-Dithiobis-

(äthylamin), das Decarboxylierungsprodukt von Cystin, im Urin von kranken Kindern gefunden (66). Über eine Ausscheidung von 1,3-Diaminopropan, Spermin und Spermidin im Urin waren keine Angaben in der Literatur zu finden.

Neuerdings wurden chromatographische Methoden entwickelt, die die Abtrennung der Diamine von anderen Aminen, sowie die Trennung der Di- und Polyamine untereinander ermöglichten und zur Identifizierung der isolierten Substanzen benutzt wurden (24, 66, 67).

In letzter Zeit wurde eine ausführliche Untersuchung der Ausscheidung von Di- und Polyaminen im Urin des Menschen von H. J. Bremer u. E. Kohne (5) vorgenommen.

Es wurden dabei gesunde Patienten aller Altersstufen und kranke Patienten untersucht, wobei man zu folgenden Ergebnissen kam: Frühgeborene und Säuglinge scheiden Spuren von Cadaverin, außerdem eben nachweisbare Mengen von Putrescin aus. Bei gesunden Kleinkindern und Erwachsenen kann keine Ausscheidung von Di- und Polyaminen im Urin festgestellt werden. Bei Kindern mit Malabsorption und schwerer bakteriell bedingter Enteritis wurden geringe Mengen an Putrescin daneben auch Spuren von Cadaverin und in einem Fall 1,3-Diaminopropan im Urin gefunden. Das Krankheitsbild der Cystinurie und das der Cystin-Lysinurie wurde untersucht. Dabei fand man inkonstant große Mengen von Cadaverin und Putrescin im Urin, daneben auch 1,3-Diaminopropan und Spermidin. In einer Urinprobe fand sich 2,2'-Dithiobis(äthylamin). Bei Kindern mit florider Vitamin-D-Mangelrachitis fanden sich relativ große Mengen von Cadaverin und Putrescin, jedoch nie so hohe Werte wie bei der Cystinurie.

Untersuchungen über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im Stuhl von Mensch und Tier

Untersuchungen über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im Stuhl sind außerordentlich spärlich. 1889 berichten von Udranszky und Baumann in ihren Untersuchungen über Cystinurie über das Vorkommen von Putrescin und Cadaverin im tierischen Stuhl (7). In neuerer Zeit wird in Arbeiten über Cystinurie bei Milne und Mitarbeiter (8, 10), außerdem bei Tabor (9) die Entstehung von Di- und Polyaminen im tierischen Colon und deren Resorption beschrieben.

Veeraraghavan und Mitarbeiter (17) wiesen die Bildung von Cadaverin bei einer von ihnen experimentell erzeugten Cholerainfektion nach und vermuteten dabei einen Zusammenhang zwischen der Darmsymptomatik bei Cholera und der großen Menge von Cadaverin.

Es gibt bis jetzt nur eine einzige zusammenfassende Arbeit über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im tierischen Stuhl von van Rheenen (32). Darin wird mit den Mitteln der Papier-Electrophorese und Papierchromatographie Spermin, außerdem 1,3-Diaminopropan, Putrescin und Cadaverin in der Faeces von Kühen nachgewiesen.

Untersuchungen über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im menschlichen Stuhl gibt es bisher nicht.

Fragestellung

In dieser Arbeit wird

1. die Methodik der Stuhlaufbereitung und das Vorhandensein von Di- und Polyaminen im menschlichen Stuhl geprüft,
2. die Methodik der säulenchromatographischen Trennung der Di- und Polyamine an Stuhlproben näher betrachtet,
3. die Wiederfindungsgenauigkeit in Prozenten berechnet, d.h. der Verlust in Prozenten an Di- und Polyaminen nach der Stuhlaufbereitung und säulenchromatographischen Trennung.

Material und Methoden

A. Materialien:

Folgende Substanzen wurden verwendet: Spermintetrahydrochlorid, Spermidinphosphat und L-Homoargininmonohydrochlorid von der Firma Fluka, Putrescindihydrochlorid von der Firma Calbiochem und Cadaverindihydrochlorid von der Firma Serva. Dowex 2 x 8, 200 - 400 mesh wurde von der Firma Serva bezogen. Die sonstigen verwendeten Chemikalien hatten die p.a.-Qualität.

B. Probanden:

Verwendet wurde Stuhl von 1 - 4 Monate alten, gesunden Säuglingen, die mit einer 2/3 Milch ernährt wurden. Der Stuhl wurde frisch von der Windel gesammelt und bis zur Verarbeitung bei - 20 - -30°C eingefroren.

C. Aufarbeitung des Stuhls:

Eine abgewogene Menge Stuhl wurde mit der zweifachen Menge destillierten Wassers in einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator homogenisiert, ein Zwanzigstel der Menge in Form von fester Sulfosalizylsäure zugegeben, umgerührt, etwa 30 Minuten lang stehen gelassen und dann zentrifugiert. Vom Überstand wurde zur Entfernung der Sulfosalizylsäure und der Anionen 1 ml auf eine Säule, die mit Dowex 2 x 8, Cl-Form, 200 - 400 mesh (Harzhöhe 5 cm, Durchmesser 2 cm) gefüllt war, gegeben.

Das Dowex wurde in die Chloridform durch sukzessive Behandlung mit 2 N Natronlauge, destilliertem Wasser und 2 N Salzsäure überführt. Anschließend wurde das Harz solange mit H₂O nachgewaschen, bis das Effluent ein pH von 5 hatte.

Nachdem 1 ml Stuhlextrakt auf das Harz gegeben worden war, wurden die Polyamine mit 10 ml H₂O und mit 15 ml 0,02 N HCl eluiert. Die zusammengefügteten Eluate wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und danach in 2 ml 0,2 N Natriumcitratpuffer, pH 2,2, gelöst.

D. Die quantitative Bestimmung der Di- und Polyamine mit Hilfe der Säulenchromatographie:

Die Trennung und die quantitative Bestimmung der Di- und Polyamine wurde an den Aminosäure-Autoanalyser BC 200 der Firma Bio-Cal Instruments, München, durchgeführt.

Verwendet wurde eine Modifikation der von Shull und Mitarbeitern (74) angegebenen Methode zur quantitativen Bestimmung von S-Adenolsylmethionin.

Folgende Puffer wurden verwendet:

Puffer A - pH 5,28, 0,35 N in bezug auf Na^+ ,

Puffer B - pH 5,5, wobei als Basis ein 0,35 N Natriumcitratpuffer, pH 5,55, diente, dem soviel NaCl zugesetzt wurde, daß als Endkonzentration von Na^+ 2,35 erreicht wurde.

Puffer A diente zur Trennung der basischen Aminosäuren und Homoarginin, Puffer B trennte die eigentlichen Di- und Polyamine. Die Zusammensetzung der Puffer zeigt die Tabelle I.

Als Harz wurde Aminex A 5 (Biorad, Inc., Richmond, Calif.) verwendet.

Die Harzhöhe betrug 8 cm, der Durchmesser 0,9 cm. Das Harz war vor der Analyse mit Puffer A äquilibriert. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 0,35 N NaOH regeneriert. Die Pufferfließgeschwindigkeit betrug 120 ml/h, die Temperatur der Säule 54°C. Die Pufferfließgeschwindigkeit verhielt sich zur Fließgeschwindigkeit des Ninhydrins wie 2 : 1. Die Gesamtanalyse dauerte etwa 3 Stunden. Nach der Elution von Homoarginin, nach 85 Minuten, wurde Puffer A auf Puffer B umgeschaltet.

Die Testsubstanzen wurden bis zur Gewichtskonstanz über konzentrierter H_2SO_4 getrocknet und nach Abwiegen einer definierten Menge in H_2O gelöst. Zwischen den Analysen wurden die Testsubstanzen bei -20°C tiefgefroren.

Der Stuhlextrakt wurde in etwa 1 ml Natriumcitratpuffer pH 2,2, gelöst und zur Analyse auf die Säule aufgetragen.

Ergebnisse

A. Säulenchromatographischer Nachweis der aliphatischen Di- und Polyamine im Stuhl:

Um aliphatische Di- und Polyamine im Stuhl nachzuweisen, wurde aus 5 g Säuglingsstuhl nach der oben geschilderten Methode ein Stuhlextrakt herge-

stellt. Von diesem Extrakt wurde jeweils eine Menge, die einem Gramm Stuhl entsprach, für die säulenchromatographische Trennung benutzt. Eine entsprechende Trennung zeigt die Abb. 1.

Es trennten sich im Elutionsbereich der aliphatischen Di- und Polyamine vier Peaks, die den Retentionszeiten nach Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin entsprechen. Diese Peaks zeigten zum Teil ein "tailing" im abfallenden Teil des Peaks, wie man es auch bei anderen basischen Aminosäuren, z.B. beim Arginin, sieht.

Um festzustellen, ob diese Peaks die gleichen Retentionszeiten wie die entsprechenden Testsubstanzen haben, wurde ein Stuhlextrakt in sieben gleiche Aliquots unterteilt und jedem dieser Aliquots 100 nMol je einer der folgenden Amine zugesetzt: 1,3-Diaminopropan, Putrescin, Cadaverin, 2,2'-Dithiobis(äthylamin), Spermidin, m-Tyramin und Spermin. Die Abb. 2 zeigt, daß beim Zusatz von Spermin zu dem Stuhlextrakt die Peakhöhe des wahrscheinlichen Sperminpeaks ansteigt, ohne daß es zu einer Verformung des Peaks kommt. Es ist damit bewiesen, daß Spermin und die im Stuhlextrakt festgestellte Substanz identische Retentionszeiten haben. Entsprechend identische Retentionszeiten fanden sich neben dem Spermin auch beim Putrescin, Cadaverin und Spermidin.

B. Berechnung der Di- und Polyamine nach säulenchromatographischer Trennung:

Für die quantitative Berechnung von Substanzen nach säulenchromatographischer Trennung ist es notwendig, die Absorptionskoeffizienten zu kennen. Bei der säulenchromatographischen Trennung mit der am verwendeten Aminosäure-Autoanalyzer vorliegenden logarithmischen Spannungsabgabe durch das Kolorimeter ist der Flächeninhalt innerhalb des Peaks der Konzentration der Substanz proportional. In die Berechnung geht eine Konstante ein, die Apparate - bedingt durch Säulenquerschnitt, Pufferfluß, Küvettenlänge und andere Faktoren - bedingt ist. Um verbindliche Werte für die quantitative Berechnung zu bekommen, die auch für andere Aminosäure-Autoanalyzer gelten, wurden die Flächeneinheiten der einzelnen Werte auf den Flächenwert einer bestimmten Konzentration von Homoarginin bezogen. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle II. Zur Bestimmung der Genauigkeit der Methode wurden Parallelbestimmungen mit Testsubstanzen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigt die Tabelle III. Nach Berechnung der Standardabweichung ergab sich als höchste Streubreite für Cadaverin ein Variationskoeffizient von 4,8%. Die der anderen Substanzen liegen darunter. Durchschnittlich betrug der Variationskoeffizient 2,5%.

C. Verluste bei der Aufbereitung des Stuhls

Um festzustellen, wieviel Substanz bei der Stuhlaufbereitung und der anschließenden säulenchromatographischen Trennung verloren geht, wurde ein Stuhlhomogenisat mit destilliertem Wasser hergestellt. Dieses Homogenisat wurde in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt. Einem Aliquot wurden definierte Mengen der Substanzen Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin zugesetzt.

Beide Teile des Stuhlhomogenisats wurden nach der oben geschilderten Methode säulenchromatographisch getrennt. Zusätzlich erfolgte eine quantitative Bestimmung der Substanzen der Lösung, aus der die Testsubstanzen dem Stuhlhomogenisat zugesetzt wurden.

Die Ergebnisse zeigt die Tabelle IV. Wie aus ihr ersichtlich ist, betragen die Durchschnittsverluste bei der Aufbereitung und säulenchromatographischen Trennung der aliphatischen Di- und Polyamine 15%.

Diskussion:

Bis zur Entwicklung hochspannungselektrophoretischer und säulenchromatographischer Methoden wurden die aliphatischen Di- und Polyamine gravimetrisch nach Präzipitation, überwiegend mit Benzoylchlorid, bestimmt. Eine genaue Bestimmung dieser Substanzen bei einem niedrigen Gehalt war mit dieser Methode nicht möglich.

Wesentliche Voraussetzungen für eine genaue Messung der Di- und Polyamine war die Entwicklung von Methoden, die zum Nachweis auch kleinerer Mengen geeignet sind, wie Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, Messung der optischen Dichte nach Überführung in die Dinitrophenyllderivate, Säulenchromatographie, Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese.

Untersuchungen über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im normalen menschlichen Stuhl gibt es bisher nicht. Da diese Substanzen jedoch bei bestimmten Aminosäure-Malabsorptionen vermehrt im Darminhalt gebildet

werden, sind entsprechende Kenntnisse jedoch notwendig.

Durch Fällungsmethoden konnten von Udránski und Baumann im Jahre 1889 (7) Cadaverin und Putrescin im Stuhl eines Patienten mit Cystinurie nachweisen. Milne und Mitarb. (10) konnten diese Befunde im Jahre 1961 bei Cystinuriepatienten bestätigen.

Im Urin werden auch bei Normalpersonen die heterozyklischen Amine Piperidin und Pyrrolidin ausgeschieden. Da diese Substanzen aus Cadaverin und Putrescin im Darm entstehen, liegt ein indirekter Beweis für die Synthese dieser Verbindung im Darminhalt vor. Es ist anzunehmen, daß aus nicht resorbiertem oder sezerniertem Lysin und Arginin durch Dekarboxylierung durch Darmbakterien die Diamine entstehen.

Untersuchungen über das Vorkommen von Di- und Polyaminen im tierischen Stuhl liegen von van Rheenen (32) vor. Van Rheenen wies mit Mitteln der Papierelektrophorese und der Papierchromatographie Spermin, 1, 3-Diaminopropan, Putrescin und Cadaverin in der Faeces von Kühen nach.

Angaben über die Herkunft von 1, 3-Diaminopropan im Stuhl liegen bisher nicht vor. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß 1, 3-Diaminopropan ein bakterielles Abbauprodukt von Spermidin ist.

Es ist anzunehmen, daß das im Stuhl nachgewiesene Spermidin und Spermin aus den Darmbakterien stammt. Ribosomen von Bakterien enthalten große Mengen Spermidin und Spermin.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß auch im normalen menschlichen Stuhl konstant Cadaverin, Putrescin, Spermidin und Spermin vorkommen. Außerdem konnten erstmalig Angaben über den Gehalt dieser aliphatischen Di- und Polyamine im Stuhl gemacht werden. Die zur Bestimmung verwendete Methode ermöglicht in einem Arbeitsgang eine Trennung der aliphatischen Di- und Polyamine und eine hinreichende quantitative Bestimmung.

Zusammenfassung:

1. Es wird eine Methode beschrieben, nach der aliphatische Di- und Polyamine aus menschlichem Stuhl an einem Aminosäure-Autoanalyser getrennt und quantitativ bestimmt werden können. Der Variationskoeffizient für die Bestimmung dieser Substanzen als Testsubstanzen am

Aminosäure-Autoanalyser betrug etwa 2,5%. Verluste dieser Substanzen bei der Aufarbeitung von Stuhl lagen bei maximal 15%. Durchschnittlich waren sie nicht höher als etwa 10%.

2. Untersucht wurde frischer Stuhl von 1 - 4 Monate alten, gesunden Säuglingen, die mit einer 2/3-Milch ernährt wurden. In ihrem Stuhl fanden sich folgende vier Di- und Polyamine: Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin.

Tabelle I: Zusammensetzung der für die säulenchromatographische Trennung der Polyamine verwendeten Puffer (g bzw. ml/10 l Puffer)

	Puffer A	Puffer B
pH	5,28	5,55
Natriumkonzentration (Normalität)	0,35	2,35
Natriumcitrat x 2 H ₂ O	343,2 g	343,2 g
37%-ige HCl	65 ml	65 ml
Brij 35-Lösung (50 g/100 ml)	20 ml	20 ml
Caprylsäure	0,5 ml	0,5 ml
NaCl	-	1260 g

Tabelle II

Faktoren zur Berechnung der Putrescin-, Cadaverin-, Spermidin- und Sperminmenge nach säulenchromatographischer Trennung der Substanzen mit einem Aminosäuren-Autoanalyzer. Der Faktor entspricht einem Quotienten der durch Teilung der Absorption dieser Substanz durch die Absorption von Homoarginin entsteht. Homoarginin wurde als interner Standard zugesetzt. Die Messung erfolgte jeweils nach Ninhydrinanfärbung bei 570 nm.

Putrescin	0,467
Cadaverin	0,200
Spermidin	0,518
Spermin	0,467

Tabelle III

Untersuchung der Genauigkeit der säulenchromatographischen Bestimmung der aliphatischen Di- und Polyamine. Zur Bestimmung kamen jeweils 0,2 nMol Substanz. Es wurden jeweils apparatespezifische Flächeneinheiten angegeben, die proportional die Menge der zu bestimmenden Substanz sind.

Flächeneinheit	Putrescin	Cadaverin	Spermidin	Spermin
Lauf 1	570	819	2113	1907
Lauf 2	612	877	2261	1992
Lauf 3	666	994	2567	2180
Lauf 4	634	920	2364	2234
Lauf 5	594	849	2372	2159
Lauf 6	597	912	2401	2106
Mittelwert X	612	895	2346	2096
Standardabweichung $\pm$ S	20	28	97	48
Variationskoeffizient	6%	6%	8,4%	3,2%

Tabelle IV

Durchschnittliche Verluste bei der Aufbereitung von Stuhl und der säulen-
chromatographischen Trennung der aliphatischen Di- und Polyamine: Ein
Stuhlhomogenat wurde in 2 gleiche Aliquots getrennt. Einem Aliquot wurden
5 uMol Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin zugesetzt. Beide
Aliquots wurden anschließend nach dem unter "Methodik" angegebenen Ver-
fahren für die säulenchromatographische Trennung vorbehandelt.

	zugegebene Menge	wiedergefundene Menge	Verluste in Prozent
Putrescin	5	4,5	10%
Cadaverin	5	4,3	14%
Spermidin	5	4,3	14%
Spermin	5	4,2	16%

LITERATURVERZEICHNIS

1. Brieger, L.: Ptomaine.
Berl.klin.Wschr. 44, (1887)
2. Guggenheim, M.: Die biogenen Amine.
S. Karger, Basel-New-York, 4. Aufl., 1951
3. Gale, E.F.: The bacterial amino-acid decarboxylases.
Adv. Enzymol. 6, 1, (1946)
4. Herbst, E.J. and Snell, E.: Putrescine and related compounds
as growth factors for *Haemophilus parainfluenzae*.
J. Biol.Chem. 181, 47, (1949)
5. E. Kohne: Die Ausscheidung von Di- und Polyaminen im Urin
des Menschen unter normalen u. patholog. Bedingungen.
Inaugural-Dissertation 1968
6. Wheaton, T.A. and Stewart, J.: Feruloylputrescine: Isolation
and identification from citrus leaves and fruit.
Nature 206, 620, (1965)
7. Von Udránszky, L. und Baumann, E.: Über das Vorkommen von
Diaminen, sogenannten Ptomainen, bei Cystinurie.
Zschr.Phys. Chem. 13, 562, (1889)
8. Asatoor, H.M.; Lacey, B.W.; London, D.R. and Milne, M.D.:
Amino-acid metabolism in cystinuria.
Clin.Sci. 23, 285, (1962)
9. Tabor, H.: Diamine oxidase.
J. Biol. Chem. 188, 125, (1959)
10. Milne, M.D.; Asatoor, A.M.; Edwards, D. and Loughridge, L.W.:
The intestinal absorption defect in cystinuria.
Gut 2, 232, (1961)
11. Von Euler, U. S.: The occurrence and determination of piperidine
in human and animal urine.
Acta Pharmacol. 1, 29, (1945)
12. Nordenström, B.E.W.: Effect of cadaverine and lysine on the urinary
excretion of piperidine in rabbits.
Acta Pharmacol. Toxicol. 7, 287, (1951)
13. Morris, D.R. and Pardee, A.B.: Multiple pathways of putrescine
biosynthesis in *E. coli*.
J. Biol.Chem. 241, 3129, (1966)
14. Michaels, R. and Kim, K.H.: Comparative studies of putrescine
degradation by microorganisms.
Biochim.Biophys.Acta 115, 59, (1966)

15. Southren, A.L.; Kobayashi, Y.; Brenner, P. and Weingold, A.B.: Diamine oxidase activity in human maternal and fetal tissues at parturition.
J.Appl.Physiol. 20, 1048, (1965)
16. Hanke, M.T. and Koessler, K.K.: Studies on proteinogenous amines.
J. Biol.Chem. 59, 855, (1924)
17. Veeraraghavan, N.; Kalyanaraman, V. and Visalakshi, V.K.: Role of pentamethylenediamine (cadaverine) in experimental Cholera infection.
Ind.J.Med.Res. 54, 117, (1966)
18. Johnston: The toxic effect of amines.
J. Infect.Dis. 42, 473, (1928)
19. Parrot: La fixation de l'histamine par les tissus du Cobaye. Sa liberation par une diamine.
Compt.rend.Soc.Biol. 142, 631, (1948)
20. Leeuwenhoek, A.: Observationes D. Antonii Leeuwenhoek, de natis e semine genitali animaculis.
Phil.trans.Roy.Soc. London 12, 1042, (1678)
21. Böttcher: Farblose Kristalle eines eiweißartigen Körpers, aus dem menschlichen Sperma dargestellt.
Arch.Path.Anat. 32, 525, (1865)
22. Schreiner, Ph.: Über eine neue organische Base in tierischen Organismen.
Liebigs Ann.Chem. 194, 68, (1878)
23. Rosenheim, M.C.: J. Physiol. 51 (1917), zit. bei Guggenheim (2)
24. Rosenthal, S.M. and Tabor, C.W.: The pharmacology of spermine and spermidine. Distribution an excretion.
J.Pharmacol.Exptl.Therap. 116, 131, (1956)
25. Dubin, D.T.: The assay and characterisation of amines by means of 2,4-dinitrofluorobenzene.
J. Biol.Chem. 235, 783, (1960)
26. Fischer, F.G. und Bohn, H.: Die Giftsekrete der Vogelspinnen.
Liebigs Ann.Chem. 603, 232, (1957)
27. Zillig, W.; Krone, W. und Albers, M.: Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine III. Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung der Ribosomen.
Hoppe Seyler's Zschr.Physiol.Chem. 317, 131, (1959)
28. Shimizu, H.; Kakimoto, Y. and Sano, I.: The determination and distribution of polyamines in mammalian nervous system.
J. Pharmacol.Exptl.Therap. 143, 199, (1964)

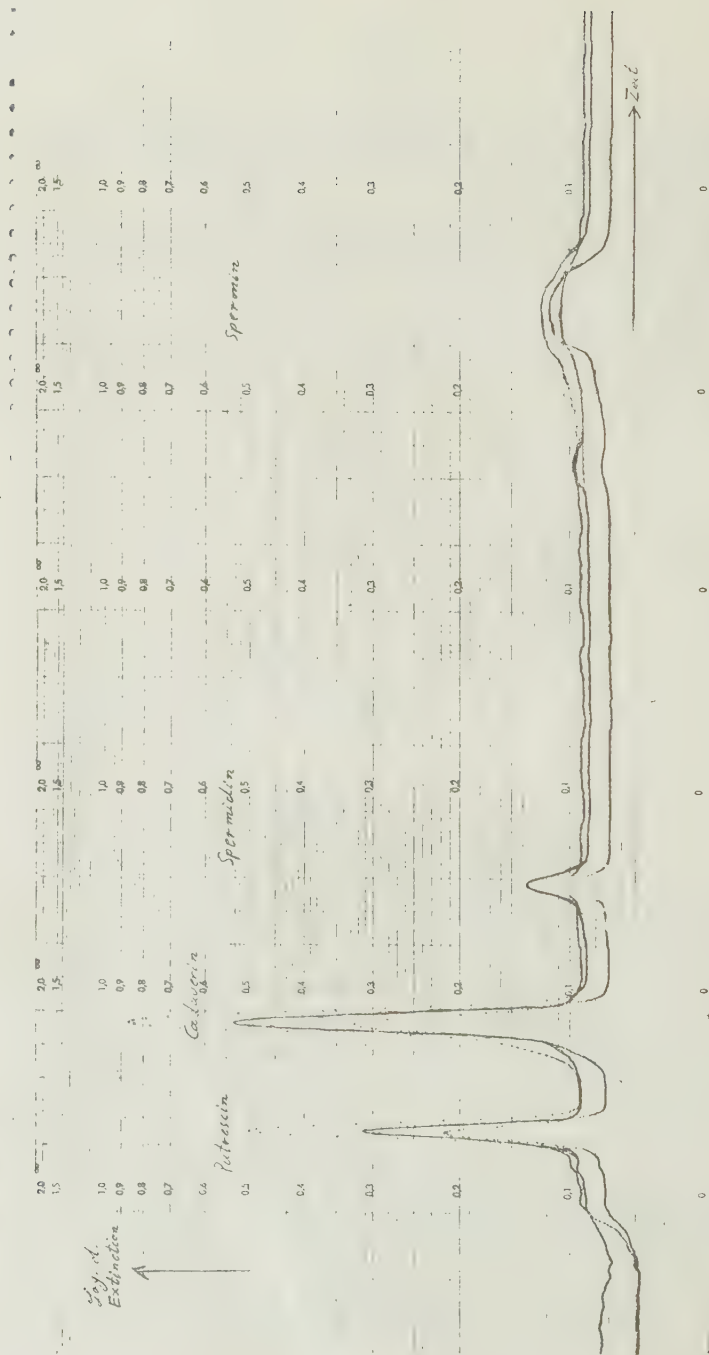
29. Perry, Th.L.; Hansen, S.; Foulks, I.G. and Ling, G.M.: Aliphatic and aromatic amines of cat brain. *J.Neurochem.* 12, 397, (1965)
30. De Meis, L. and de Paula, H.: Polyamines and muscle relaxation. Inhibition of actomyosin ATPase activity by spermine and spermidine. *Arch.Biochem.Biophys.* 119, 16, (1967)
31. Caldarera, C.M.; Barbiroli, B. and Moruzzi, G.: Polyamines and nucleic acids during development of the chick embryo. *Biochem.J.* 97, 84, (1965)
32. Van Rheenen, L.L.: High voltage paper electrophoretic and paper-chromatographic identification of biogenic amines in faeces of normal dairy cattle. *Rec.Trav.Chim.des.Pay Bas* 82, 225, (1963)
33. Fischer, F.G. und Bohn, H.: Über die Bestimmung von Spermin, Spermidin und anderen biogenen Aminen nach papierelektrophoretischer Abtrennung und ihre Mengenverhältnisse in tierischen Organen. *Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol.Chem.* 308, 108, (1957)
34. Kosaki, zit. bei Tabor (35)
35. Tabor, H. Tabor, C.W. and Rosenthal, S.M.: The biochemistry of the polyamines: spermidine and spermine. *Ann.Rev.Biochem.* 30, 579, (1961)
36. Tabor, H.; Rosenthal, S.M. and Tabor, C.W.: The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine and methionine. *J.Biol.Chem.* 233, 907, (1958)
37. Herbst, F.J.; Weaver, R.H. and Keister, D.L.: Gram reaction and cell composition: Diamines and polyamines. *Arch.Biochem.Biophys.* 75, 171, (1958)
38. Kay, D.: The inhibition of bacteriophage multiplication by proflavine and its reversal by certain polyamines. *Biochem. J.* 73, 149, (1959)
39. Ackermann: Die biogenen Amine der Puppe des Seidenspinners *Bombys mori* L.. *Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol.Chem.* 302, 87, (1955)
40. Moruzzi, G. and Calderera, C.M.: Occurence of Polyamines in the germs of cereals. *Arch.Biochem.Biophys.* 105, 209, (1964)
41. Cohen, S.S. and Lichtenstein, J.: Polyamines and ribosome structure. *J.Biol.Chem.* 235, 236, (1966)
42. Raina, A. and Telaranta, T.: Association of Polyamines and RNA in isolated subcellular particles from rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* 138, 200, (1967)

43. Weaver, R.H. and Herbst, E.J.: The oxidation of polyamines by *Neisseria perflava*.
J.Biol.Chem. 231, 646, (1958)
44. Tabor, C.W.; Tabor, H. and Rosenthal, S.M.: Purification of amine oxidase from beef plasma.
J.Biol.Chem. 208, 645, (1954)
45. Tabor, H.; Tabor, C.W. and Bachrach, U.: Identification of the aminoaldehydes produced by the oxidation of spermine and spermidine with purified plasma amine oxidase.
J.Biol.Chem. 239, 2194, (1964)
46. Dubin, D.T. and Rosenthal, S.M.: The acetylation of polyamines in *Escherichia coli*.
J. Biol.Chem. 235, 776, (1960)
47. Bachrach, U.: Spermidine oxidase from *Serratia marcescens*.
J.Biol.Chem. 237, 3443, (1962)
48. Razin, S. and Rozansky, R.: Mechanism of antibacterial action of spermine.
Arch.Biochem.Biophys. 81, 36, (1959)
49. Herbst, F.J. and Shell, E.E.: Putrescine as a growth factor for *Haemophilus influenzae*.
J.Biol.Chem. 176, 989, (1948)
50. Weaver, R.H. and Herbst, E.J.: Metabolism of diamines and polyamines in microorganisms.
J.Biol.Chem. 231, 637, (1958)
51. Herbst, E.J. and Weaver, R.H.: The oxidation of polyamines by *Neisseria perflava*.
J.Biol.Chem. 231, 646, (1958)
52. Ames, B.N.; Dubin, D.T. and Rosenthal, S.M.: Presence of polyamines in certain bacterial viruses.
Science 127, 814, (1958)
53. Cantoni, G.L.: Action of spermine on soluble ribonucleic acid and some polynucleotides.
Nature 188, 301, (1960)
54. Felsenfeld, G. and Huang, S.: The interaction of polynucleotides with metal ions, amino acids and polyamines.
Biochim.Biophys.Acta 37, 425, (1960)
55. Ames, B.N. and Dubin, D.T.: The role of polyamines in the neutralisation of bacteriophage desoxyribonucleic acid.
J.Biol.Chem. 235, 769, (1960)

56. Brewer, E.N. and Rusch, H.P.: Control of DNA replication: Effect of spermine in nuclei isolated from *Physarum polycephalum*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 25, 579, (1966)
57. Dykstra, W. and Herbst, E.: Spermidine in regenerating liver: Relation to rapid synthesis of ribonucleic acid. *Science* 149, 428, (1965)
58. Fisher, E.R. and Rosenthal, S.M.: Pathology and pathogenesis of spermine induced renal disease. *Arch.Pathol.* 57, 244, (1954)
59. Mills, J. and Dubin, D.T.: Some effects of spermine on *Escherichia coli*. *Mol. Pharmacol.* 2, 311, (1966)
60. Stadthagen, M. und Brieger, L.: Über Cystinurie. *Berl.klin.Wschr.* 26, 244, (1889)
61. Garcfá, S.A.: Über Ptomaine. *Hoppe-Seyler's Zschr.Phys.Chem.* 17, 577, (1893)
62. Ackermann, D. und Kutscher, F.: Über das Vorkommen von Lysin im Harn bei Cystinurie. *Z.Biol.* 57, 355, (1912)
63. Garrod, A.E.: The Croonian lectures on inborn errors of metabolism, Lecture IV, Cystinuria. *Lancet* 214, (1908)
64. Loewy und Neuberg: Über Cystinurie. *Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol.Chem.* 43, 338, (1904)
65. Bödtker, E.: Beitrag zur Kenntnis der Cystinurie. *Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol.Chem.* 393, (1905)
66. Perry, Th.L. and Schroeder, W.: The occurrence of amines in human urine: Determination by combined ion exchange and paper chromatographie. *J.Chromatog.* 12, 358, (1963)
67. Holder, S. und Bremer, H.J.: Bestimmung der Di- und Polyamine im Urin. Chromatographische Methoden zur Anreicherung, Trennung und Identifizierung. *J. Chromatog.* 25, 48, (1966)
68. Kakimoto, Y. and Armstrong, M.D.: *J.Biol.Chem.* 237, 208, (1962), zitiert bei (67)
69. Dent, C.E. and Rose, G.A.: Amino acid metabolism in cystinuria. *Quart.J.Med. New Series XX*, 79, (1951)
70. Stein, W.H.: Excretion of amino acids in cystinuria. *Proc.Soc.Exp.Biol.* 78, 705, (1951)

71. Linneweh, F.: Erbliche Stoffwechselkrankheiten.
München u. Berlin, Urban und Schwarzenberg 1962
72. Schreier, K.: Die angeborenen Stoffwechselanomalien.
Stuttgart, G. Thieme 1963
73. Siimes, M.: Studies on the Metabolism of 1,4-¹⁴C-spermidine and
1,4-¹⁴C-spermine in the rat.
Acta physiol.scand. 1967; Supplementum 298
74. K.H. Shull; J. McConomy; M.Vogt; A. Castillo and E. Farber,
J. Biol.Chem. 241 (1966) 5060.

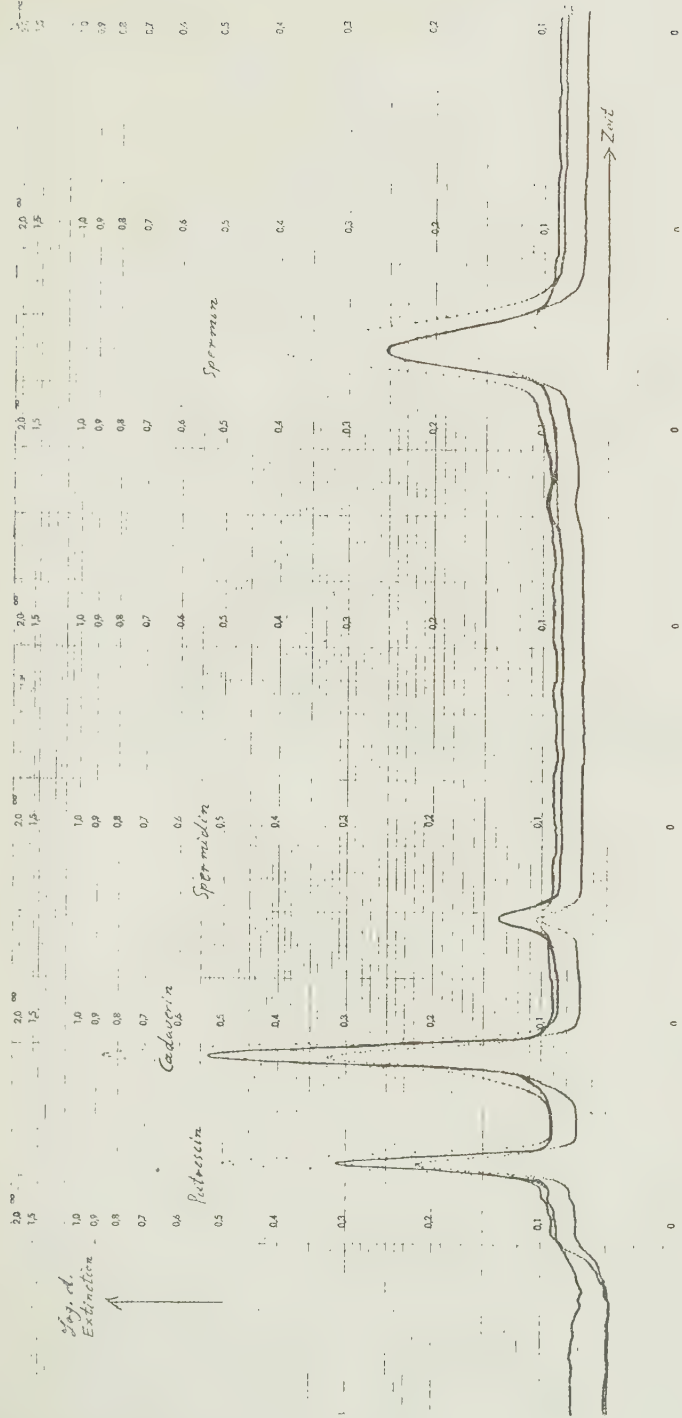
Abbildung 1 Säulenchromatographische Trennung von 1 g Stuhlextrakt



Es trennten sich im Elutionsbereich der aliphatischen Di- und Polyamine vier Peaks, die den Retentionszeiten nach in folgender Reihenfolge Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin entsprechen.

Abbildung 2

Erhöhung des Spermin-Peaks durch Zusatz



Die Abbildung zeigt, daß beim Zusatz von Spermin zum Stuhlextrakt die Peakhöhe des wahrscheinlichen Spermin-Peaks ansteigt, ohne daß es zu einer Verformung des Peaks kommt. Es ist damit bewiesen, daß Spermin und die im Stuhlextrakt festgestellte Substanz identische Retentionszeiten haben.

Lebenslauf

Peter Waizenegger, geboren am 27.12.1943 in München

Schulbildung:

1949-1953 Volksschule in München

1953-1963 Oberrealschule an der Frühlingsstraße München

Juni 1963 Abitur

Medizinstudium in München

Dezember 1969 Staatsexamen

nach Medizinalpraktikantenzeit im

Februar 1971 Approbation

November 1972 bis Januar 1973 Wehrdienst als

Stabsarzt in Landsberg.

Seit Juli 1971 bis jetzt (mit Unterbrechung der Wehrdienstzeit) im Bezirkskrankenhaus München-Haar als Assistenzarzt tätig in der Fachrichtung Psychiatrie und Neurologie.

Oktober 1974

